[ジスルフィド結合を有するタンパク質の合成]

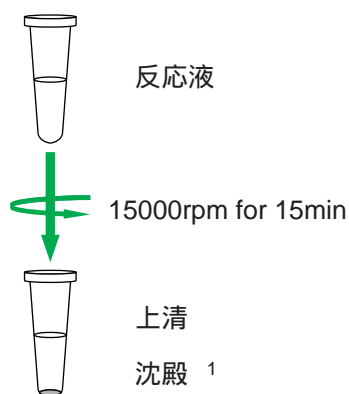
通常、無細胞タンパク質合成系は、還元条件下でタンパク質合成を行うために反応液中にDTTなどの還元剤を含みます。このためジスルフィド結合を有するタンパク質の場合、不溶化したり、活性がないなどの問題が生じています。この打開策として、反応液組成の改良やミクロソーム膜の添加が行われていますが、タンパク質合成量自体が低下する傾向にあるようです。
そこで今回は、Transdirect *insect cell* を用いて、大腸菌アルカリフォスファターゼ(S-S結合2本)を活性型として得るための検討を行いましたので報告します。

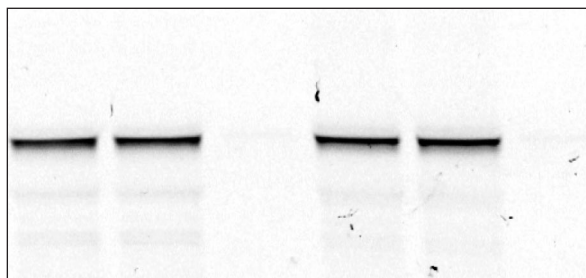
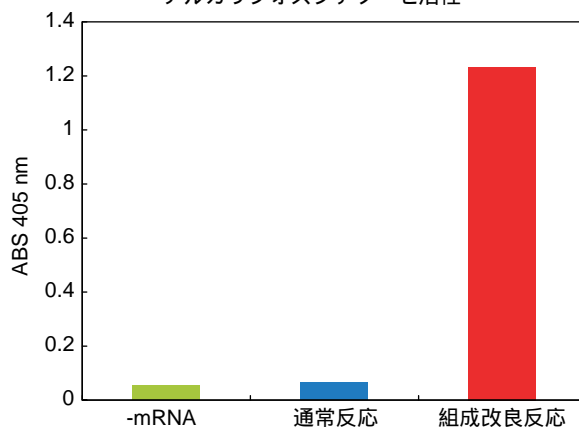
実験手順

◆反応液

15000rpm for 15min

◆上清

◆沈殿※1

通常の反応と反応液の組成を改良した反応を行いました。どちらの反応系もメチオニン、mRNAは共通して使用し、組成を改良した反応では、反応系よりDTTを除去して行いました※2。反応後、それぞれ遠心分離を行い、上清画分と沈殿画分を回収しました。可溶化の確認には、反応液、上清、沈殿の各画分を、また活性の確認には上清の画分を用いました。

※1 反応液と等量となる滅菌水に懸濁しました。
※2 詳細につきましてはお問い合わせください。

通常反応においては、不溶化はしないものの活性型として得ることはできませんでした。しかしながら反応系よりDTTを除去することによって、透析等の後処理なしでジスルフィド結合を有するタンパク質を活性型として取得することが出来ました。なおこの場合、著しいタンパク質合成量の低下は見られませんでした。

以上のように、Transdirect *insect cell* を用いた無細胞タンパク質合成において反応液の組成を改良することにより、タンパク質合成量が低下することなくジスルフィド結合を有するタンパク質が活性型として取得できる一例を示すことが出来ました。

無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

方 法

・発現ベクターpTD1へのクローニング及びmRNAの調製

大腸菌アルカリフォスファターゼのORFをキット付属の取扱説明書に従い、pTD1にクローニングした。
その後、キット付属の取扱説明書に従ってmRNAの調製を行った。

・タンパク質合成

タンパク質合成は、キット付属の取扱説明書に従い、蛍光標識されたリジン※1を取り込ませて行った。
また、組成改良反応はInsect Cell Extract 及び Reaction BufferよりDTTを除去して行った※2。

※1 FluoroTect™ Green$_{Lys}$ in vitro Translation Labeling System (Promega, L5001)
※2 詳細についてはお問い合わせください。

・合成タンパク質の検出と活性の測定

SDS-PAGE法により分離した後、蛍光イメージアナライザーを用いて検出した。
アルカリフォスファターゼ活性の測定は、 2 µLの反応液を用いて、以下の組成(300 µL)で行った。
37℃で10分間インキュベーションし、405nmの吸光度を測定した。
組成：1M Tris-HCl (pH 8.0)、1mM 酢酸マグネシウム、1mM *p*-ニトロフェニルリン酸

技術に関するお問合せは・・・

分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット

TEL　(075) 823-1351
WEB　https://solutions.shimadzu.co.jp/form/biotech/contact.html
E-Mail　t-direct@shimadzu-biotech.jp

Transdirect *insect cell* (P/N 292-30000-91)

■キット内容
・Insect Cell Extract（黄）×５本
・4mM Methionine（赤）×１本
・0.5 µg/µL pTD1 Vector（緑）×１本
・Reaction Buffer（青）×１本
・0.5 µg/µL Control DNA（白）×１本
・取扱説明書

■反応回数：４０回（５０µL合成反応系）
■保存温度：－８０℃
■価　　格：３１,１８５円（税込）

〈ご注意〉・試薬キットロット間の合成量には、多少の差が見られますがご了承ください。
・概観及び仕様は予告なく変更することがありますのでご了承ください。
・本製品の使用は試験研究用のみです。臨床、医薬品・食品製造用途には使用できません。

バルクキット（受注生産のため、詳細はお問い合せください。）

		■価格（税込）
２０キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット２０ (P/N 292-30000-92)	４０４,２５０円
５０キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット５０ (P/N 292-30000-93)	９２４,０００円
１００キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット１００ (P/N 292-30000-94)	１,６１７,０００円

バルクキットには、pTD1 VectorとControl DNAは含まれません。

※価格は２００８年１０月１日現在のものです。
※仕様および価格は改良のため，予告なく変更することがありますので，ご了承ください。

JQA-0376

島津製作所　分析計測事業部　604-8511　京都市中京区西ノ京桑原町1

バイオ・臨床ビジネスユニット
604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1（075）823-1351
http://www.shimadzu-biotech.jp/

取次店

3219-11802-500-IK